

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09389

研究課題名（和文）悪性グリオーマのグルタミン飢餓状態による一炭素代謝経路の調整と新規治療標的の探索

研究課題名（英文）One carbon metabolism for glioma cells to survive glutamine starvation

研究代表者

田中 一寛（TANAKA, KAZUHIRO）

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70467661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：悪性グリオーマの腫瘍内環境は一様でなく、特に中心部は低酸素・低栄養状態に曝されており、グリオーマ細胞の増殖停止や細胞死の原因になるが、一部の細胞は代謝的順応・適応に成功し、その変化は更なる悪性化プロセスの転機になると考えられる。本研究では、グリオーマ患者の術前MRスペクトロスコピー検査のLC-modelによるデータ解析やグリオーマ手術検体（組織）およびグリオーマ培養細胞を用いたガスクロマトグラフィー/質量分析計によるメタボローム解析によって、グルタミン飢餓状態を代償するグリオーマの細胞内代謝機構にセリン合成や一炭素代謝が関与することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性グリオーマの腫瘍内環境は一様でなく、特に中心部は低酸素・低栄養状態に曝されており、グリオーマ細胞の増殖停止や細胞死の原因になるが、一部の細胞は代謝的順応・適応に成功し、その変化は更なる悪性化プロセスの転機になると考えられる。本研究ではグルタミン飢餓状態のグリオーマ細胞内代謝変化（リプログラミング）を解析することによってセリン合成と一炭素代謝が中心的な役割を担うことを検証し、付随する代謝遺伝子の発現変化が悪性グリオーマの効果的な新規治療法の標的となる可能性を報告した。未だ著効薬のない悪性グリオーマに対して細胞内代謝機構に基づいた新しい治療戦略の一助になると思われる。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells optimize nutrient utilization to supply energetic and biosynthetic pathways. This metabolic process also includes redox maintenance and epigenetic regulation through nucleic acid and protein methylation, which enhance tumorigenicity and clinical resistance. Here, we found that glutamine-deprived GBM cells showed higher levels of serine, cysteine, and methionine with upregulated expression of genes to regulate serine synthesis and one-carbon metabolism. In human glioma samples, MTHFD2 expression was highest in the nutrient-poor regions around “pseudopalisading necrosis.” Serine synthesis was mediated through autophagy rather than glycolysis. Importantly, suppression of MTHFD2 and autophagy inhibition impaired glioma cells in glutamine-deprived conditions. These findings may have important implications for serine-dependent one-carbon metabolism for glioma cells to survive glutamine starvation.

研究分野：脳神経外科

キーワード：一炭素代謝 セリン合成 グルタミン飢餓 グリオーマ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は脳に発生する悪性腫瘍で、集学的治療を施しても生存期間中央値はいまだ1年半と極めて予後不良の疾患である。多くの癌(グリオーマ)細胞ではグルコースやアミノ酸、脂質などが互いに密接な連携を保ちながら細胞増殖・分裂に必要なエネルギー産生・生合成に関与し、細胞内代謝のリモデリング、多様性を担保していると考えられる。一炭素代謝(one carbon metabolism)は葉酸の誘導体であるテトラヒドロ葉酸(tetrahydrofolate: THF)にセリンから炭素一分子が供与されていくつかの代謝産物が合成される経路であり、核酸DNAやRNAの核となるプリン、ピリミジン合成経路、エピジェネティクスの中心的反応であるメチル化に関連するメチル基転移経路などに深く関与する(Locasale JW et al, Nature reviews 2013)。

異常な増殖を示すがん細胞では、この一炭素代謝が亢進していることは既に知られている事実であるが、腫瘍内環境は一様でなく、特に中心部は低酸素・低栄養状態に曝されている。我々はグリオーマ患者のMR Spectroscopy検査の先行研究(Tanaka K et al, J Clin Invest. 2015)において腫瘍辺縁部より中心部において、乳酸濃度の上昇およびグルタミンやグルタミン酸濃度の低下を確認しており、栄養飢餓状態による過度の解糖系亢進が生じていると推測される。しかし、グリオーマ細胞がこのような環境に適合、応答していくための一炭素代謝の調整や付随する分子機能の変化については未だ不明な点が多く、解明を要する課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では悪性グリオーマの腫瘍内代謝環境が不均一であることに着目し、腫瘍細胞が栄養飢餓状態(グルタミン飢餓状態)に適合していくメカニズムを明らかにする。グルタミン飢餓状態のグリオーマ細胞ではアミノ酸代謝のリプログラミングが起こるため、セリン、グリシンなどの関与する一炭素代謝が持つ重要な役割を明らかにする。さらに、セリン新生の経路や一炭素代謝で重要な代謝遺伝子の同定などを検討し、効果的な治療ターゲットを模索する。

### 3. 研究の方法

本研究では質量分析計による網羅的な代謝産物評価によってアミノ酸飢餓状態が悪性グリオーマ細胞内代謝に与える影響を解析する。特に、グルタミン飢餓状態のグリオーマ細胞内代謝変化を探索するため、グルコース代謝やTCA回路、他のアミノ酸代謝、一炭素代謝を中心とした代謝回路、ミトコンドリア機構の解析を行う。また、グルタミン飢餓状態のグリオーマ細胞が生存、増殖を維持するための分子機能変化や遺伝子発現の変化を解明し、効果的な新規治療法の開発を模索する。

MRスペクトロスコピーを用いた術前グリオーマの代謝物解析: グリオーマ患者の術前MRスペクトロスコピー検査により種々の代謝物を測定し、LC-modelを用いて解析する。

質量分析装置を用いたメタボローム解析、代謝Flux解析: 手術で得られた腫瘍組織やグリオーマ培養細胞を利用して神戸大学質量分析センターのガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC-MS)によるメタボローム解析を行い、グルコース代謝系、グルタミン代謝系、TCA回路系の代謝産物、アミノ酸代謝について網羅的に解析する。さらに、<sup>13</sup>Cを含む炭素源(グルコース)を用いて細胞内代謝物の流れについて質量分析計を用いて解析する。

プリン・ピリミジン代謝、核酸合成の解析: 神戸大学質量分析センターの液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC-MS)を利用し、プリン・ピリミジン代謝過程に生成される脂溶性代謝産物の測定を行い、核酸合成やDNAメチル化などについて解析を行う。

セリン合成や一炭素代謝に関する代謝遺伝子の発現・機能解析: セリン合成に関する代謝関連遺伝子や葉酸・一炭素代謝の関連遺伝子などの発現をmRNAレベルや蛋白レベルで解析する。また、遺伝子操作による発現抑制や発現過剰を行い、グルタミン飢餓状態のグリオーマ細胞に及ぼす影響を機能解析する。

Autophagyおよびミトコンドリア機能の解析: グルタミン飢餓状態で誘導されるAutophagyと代謝変化との関連を解析する。また、ミトコンドリア機能についてATP産生量、活性酸素種(mitoSOX)などで解析し、細胞増殖やアポトーシス誘導との関係性を評価する。さらにAutophagy阻害薬を用いて細胞内代謝変化や細胞機能の評価を行う。

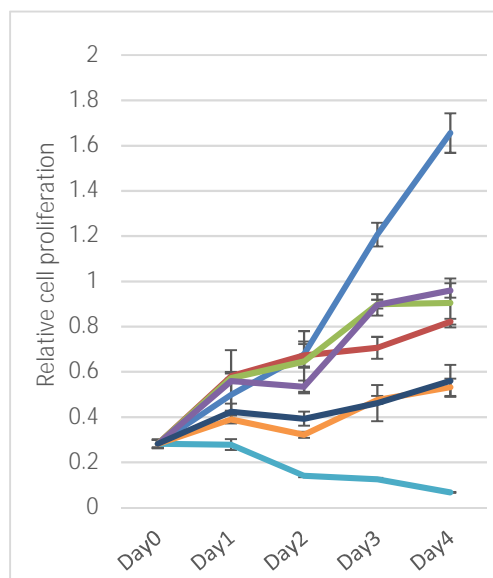
治療ターゲットの同定および悪性グリオーマ標本での解析: 得られた結果から栄養飢餓状態の悪性グリオーマ細胞の生存、増殖に関連する代謝関連遺伝子を同定し、遺伝子操作によって抗腫瘍効果を評価する。また、グリオーマ患者において摘出組織でのタンパク発現解析や免疫組織学的染色を行い、悪性度や予後との相関を解析する。

### 4. 研究成果

- (1) グリオーマ患者の手術で得られた腫瘍組織を用いたメタボローム解析では、腫瘍の中心部は辺縁よりグルタミン・グルタミン酸の濃度が低いが、セリンやグリシン、メチオニンなどいくつかのアミノ酸濃度の著明な上昇を認めた。グリオーマ培養細胞を用いた実験でもグルタミン不含培地で同様の結果を得たため、これらの結果からグルタミン飢餓状態を代償

するグリオーマの細胞内代謝機構が働いていると想定された。

- (2) セリン合成や一炭素代謝に注目して、その関連する代謝遺伝子の発現解析をリアルタイム PCR 法で行い、セリン合成に関する代謝関連遺伝子 Phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1)、葉酸・一炭素代謝関連遺伝子 Serine hydroxymethyl transferase 2 (SHMT2), Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1L/2 (MTHFD1L/2)の発現上昇を確認した。グリオーマ腫瘍検体でも Western blot による蛋白発現を解析し、腫瘍では正常脳組織より SHMT2 や MTHFD2 の発現が高いことを確認した。
- (3) MTHFD2 遺伝子に注目し、siRNA による MTHFD2 遺伝子発現抑制によってグルタミン飢餓状態にあるグリオーマ細胞に効果的な細胞死を誘導すること、それには reactive oxygen species (ROS)が関与することを同定した。これらの結果から、グルタミン飢餓状態にあるグリオーマ細胞の生存に一炭素代謝に関与する MTHFD2 遺伝子が重要な役割を担っていることが示唆された。
- (4) セリン合成の機序については、代謝 Flux 解析によってグルタミン飢餓によるオートファジーが強く影響することを見出した。グルタミン (Gln) 飢餓状態でのグリオーマ細胞内には電子顕微鏡解析でオートファジーによって多数の小胞 (vesicle) 形成を認め、蛍光免疫染色法や Western blot による解析でミトコンドリア内の Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2)の発現が上昇していることを確認した。また、U87 グリオーマ細胞に対してオートファジー阻害剤であるクロロキシン (CQ)を用いた実験系では、セリン合成が抑制されてグルタミン飢餓状態を代償できずに細胞死が誘導されることを確認した (右図)。



- Gln+
- Gln-
- Gln- CQ (20μM)
- Gln- Serine (0.4mM)
- Gln- CQ Serine (0.4mM)
- Gln- Serine (2.0mM)
- Gln- CQ Serine (2.0mM)

#### <引用文献>

- Tanaka K, Sasayama T, Nagashima H, Irino Y, Takahashi M, Izumi Y, Uno T, Satoh N, Kitta A, Kyotani K, Fujita Y, Hashiguchi M, Nakai T, Kohta M, Uozumi Y, Shinohara M, Hosoda K, Bamba T, Kohmura E. Glioma cells require one-carbon metabolism to survive glutamine starvation. *Acta Neuropathol Commun.* 2021 Jan 19;9(1):16.
- Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, Kyotani K, Mizowaki T, Imahori T, Ejima Y, Masui K, Gini B, Yang H, Hosoda K, Sasaki R, Mischel PS, Kohmura E. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. *J Clin Invest.* 2015 Apr;125(4):1591-602.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Tanaka K, Sasayama T, Nagashima H, Irino Y, Takahashi M, Izumi Y, Uno T, Satoh N, Kitta A, Kyotani K, Fujita Y, Hashiguchi M, Nakai T, Kohta M, Uozumi Y, Shinohara M, Hosoda K, Bamba T, Kohmura E.	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Glioma cells require one-carbon metabolism to survive glutamine starvation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01114-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashiguchi M, Tanaka K, Nagashima H, Fujita Y, Tanaka H, Kohta M, Nakai T, Uozumi Y, Maeyama M, Soniya Y, Kohmura E, Sasayama T	4. 巻 160
2. 論文標題 Glutamic acid and total creatine as predictive markers for epilepsy in glioblastoma by using magnetic resonance spectroscopy prior to surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 e501-e510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2022.01.056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Goldman S, Margol A, Hwang EI, Tanaka K, Suchorska B, Crawford JR, Kesari S	4. 巻 12
2. 論文標題 Safety of Tumor Treating Fields (TTFields) therapy in pediatric patients with malignant brain tumors: Post-marketing surveillance data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Oncol.	6. 最初と最後の頁 958637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.958637.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Maeyama M, Tanaka K, Nishihara M, Irino Y, Shinohara M, Nagashima H, Tanaka H, Nakamizo S, Hashiguchi M, Fujita Y, Kohta M, Kohmura E, Sasayama T.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Metabolic changes and anti-tumor effects of a ketogenic diet combined with anti-angiogenic therapy in a glioblastoma mouse model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79465-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Y, Nagashima H, Tanaka K, Hashiguchi M, Hirose T, Itoh T, Sasayama T.	4. 巻 149
2. 論文標題 The Histopathologic and Radiologic Features of T2-FLAIR Mismatch Sign in IDH-Mutant 1p/19q Non-codeleted Astrocytomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 253-260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2021.02.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minami N, Tanaka K, Sasayama T, Kohmura E, Saya H, Sampetean O.	4. 巻 11(5)
2. 論文標題 Lactate Reprograms Energy and Lipid Metabolism in Glucose-Deprived Oxidative Glioma Stem Cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites.	6. 最初と最後の頁 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11050325.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita Y, Kohta M, Sasayama T, Tanaka K, Hashiguchi M, Nagashima H, Kyotani K, Nakai T, Ito T, Kohmura E.	4. 巻 137
2. 論文標題 Intraoperative 3-T Magnetic Resonance Spectroscopy for Detection of Proliferative Remnants of Glioma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Neurosurg.	6. 最初と最後の頁 149-157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2020.01.217.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田中一寛、橋口充、岩橋洋文、長嶋宏明、篠山隆司
2. 発表標題 MRSを用いたグルタミン酸および総クレアチン測定による膠芽腫てんかん発作の術前予測
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka K, Nagashima H, Iwahashi H, Hashiguchi M, Sasayama T
2. 発表標題 Serine and one carbon metabolism adapting glioma cells to low glutamine microenvironment
3. 学会等名 27th Annual Scientific Meeting and Education Day of the society for Neuro Oncology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中一寛、長嶋宏明、藤田祐一、岩橋洋文、藤本陽介、岡田雅子、溝渕知司、篠山隆司
2. 発表標題 言語野および運動野近傍の神経膠腫に対する覚醒下手術の現状と問題点
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中一寛、篠山隆司、橋口充、藤田祐一、中井友昭、谷口理章
2. 発表標題 初発神経膠芽腫に対する光線力学療法 (PDT)の効果と問題点
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中一寛、豊田昌徳、金原史朗、山本暢之、橋口充、藤田祐一、南博信、篠山隆司
2. 発表標題 神戸大学医学部附属病院におけるがんゲノム医療の体制と現状
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホーム > 研究 > 脳腫瘍  
<https://www.med.kobe-u.ac.jp/neuro/study/brain-tumor.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠山 隆司  (Sasayama Takashi)  (10379399)	神戸大学・医学部附属病院・教授    (14501)	
研究分担者	中溝 聡  (Nakamizo Satoshi)  (00569238)	神戸大学・医学研究科・医学研究員    (14501)	
研究分担者	篠原 正和  (Shinohara Masakazu)  (80437483)	神戸大学・医学研究科・准教授    (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------